© Коллектив авторов, 2020
УДК 616.34-007.272-036.11
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15088>
ISSN – 2073-8137

ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДИНАМИЧЕСКОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ

М. А. Топчиев¹, Д. С. Паршин¹, Л. А. Бруснев², М. К. Чотчаев²

¹ Астраханский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

² Ставропольский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

POSSIBILITIES OF DRUG EXPERIMENTAL SIMULATION OF DYNAMIC INTESTINAL OBSTRUCTION

Topchiev M. A.¹, Parshin D. S.¹, Brusnev L. A.², Chotchaev M. K.²

¹ Astrakhan State Medical University, Russian Federation

² Stavropol State Medical University, Russian Federation

Исследование по созданию экспериментальной модели острой динамической кишечной непроходимости с использованием фармакологических эффектов лоперамида проведено на 36 крысах-самцах линии Wistar. Все животные были разделены на 3 группы. Лоперамид вводился 2 раза в сутки с интервалом 12 часов в течение 5 суток в суточной дозе 0,022; 0,044 или 0,09 мг/кг. Результаты оценивались по количеству дефекаций, макро- и микроскопической картине, морфометрическим данным. В результате морфологических исследований в первой и второй группах макроскопические, гистологические и морфометрические изменения стенки тонкой кишки в исследуемые сроки не имели достоверных отличий от нормальных значений. Модель компенсированной динамической кишечной непроходимости достигалась в третьей группе животных (0,09 мг/кг/сутки) через 72 часа после начала эксперимента. Через 120 часов после начала эксперимента у животных формировалась модель декомпенсированной динамической кишечной непроходимости с характерными макро- и микроскопическими изменениями кишечника.

Ключевые слова: динамическая кишечная непроходимость, паралитический илеус, морфометрический анализ, патоморфология кишечника

A study to create an experimental model of acute dynamic intestinal obstruction using the pharmacological effects of Loperamide was carried out on 36 male Wistar rats. All animals were divided into 3 groups. Loperamide was administered 2 times a day at 12-hour intervals for 5 days at a daily dose of 0.022 mg/kg, 0.044 mg/kg or 0.09 mg/kg. The results were assessed by the number of defecations, macro- and microscopic picture, morphometric data. As a result of morphological studies in the first and second groups, macroscopic, histological and morphometric changes in the wall of the small intestine during the study period did not differ significantly from normal values. The model of compensated dynamic intestinal obstruction was achieved in the third group of animals (0.09 mg/kg/day) 72 hours after the start of the experiment. 120 hours after the start of the experiment, the animals formed a model of decompensated dynamic intestinal obstruction with characteristic macro- and microscopic changes in the intestine.

Keywords: dynamic intestinal obstruction, ileus paralytic, morphometric analysis, intestinal pathomorphology

Для цитирования: Топчиев М. А., Паршин Д. С., Бруснев Л. А., Чотчаев М. К. ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДИНАМИЧЕСКОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(3):373-376. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15088>

For citation: Topchiev M. A., Parshin D. S., Brusnev L. A., Chotchaev M. K. POSSIBILITIES OF DRUG EXPERIMENTAL SIMULATION OF DYNAMIC INTESTINAL OBSTRUCTION. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(3):373-376. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15088> (In Russ.)

ДКН – динамическая кишечная непроходимость

Острая кишечная непроходимость выявляется у 5 заболевших на 100 тысяч человек, определяя от 3 до 5 % госпитализации в хирургические стационары. Летальность при дан-

ной патологии остаётся высокой и, по данным разных авторов, колеблется от 5,1 до 8,4 %, занимая одно из ведущих мест среди всех urgentных хирургических заболеваний. Послеоперацион-

ная кишечная непроходимость является частым осложнением хирургического вмешательства, особенно абдоминальной хирургии [1, 2].

Экономическая составляющая затрат на лечение острой тонкокишечной непроходимости сопоставима с затратами на лечение больных с раком желудка и раком прямой кишки, а на 300 000 пациентов, оперированных по поводу острой кишечной непроходимости, США выделяются средства в объеме 1,3 миллиарда долларов [3, 4].

В современной клинической практике сложились условия для решения проблемы с динамической кишечной непроходимостью (ДКН). Сложность представляют полиэтиологичность данного заболевания, коморбидность и возраст пациентов, лекарственный анамнез, что затрудняет дифференциальную диагностику кишечной непроходимости. Этот факт зачастую приводит к напрасным операциям по поводу ДКН, которая может быть разрешена консервативными мерами [5].

В настоящее время разработано множество экспериментальных моделей механической кишечной непроходимости, изучен ее патогенез, а также характерные морфологические изменения [6–8]. Вместе с тем экспериментальные, неинвазивные модели ДКН отсутствуют. Учитывая полиэтиологичность данного заболевания, недостаточно изучен патогенез и морфологические изменения, характерные для ДКН.

Цель исследования – морфофункциональный анализ тонкого кишечника при экспериментальной модели острой ДКН у крыс при использовании различных доз лоперамида.

Материал и методы. Исследование проведено на 36 крысах-самцах линии Wistar с массой тела 250 ± 30 г, сопоставимых по возрасту. Трех группам животных (по 12 особей) перорально вводился лоперамида гидрохлорид 2 раза в сутки с интервалом 12 часов в течение 2–5 суток из расчета $0,022$ мг/кг/сут, $0,044$ мг/кг/сут и $0,09$ мг/кг/сут соответственно. После моделирования патологии крысы по одной располагались на белом листе бумаги для оценки количества дефекаций (болюсов) в течение 24 часов. Учитывалось среднее число дефекаций по количеству болюсов. Животные под наркозом выводились из эксперимента на 2, 3, 4, 5-е сутки (по 3 особи из каждой группы) с последующим забором образцов тонкого кишечника для проведения патоморфологического исследования.

Образцы ткани фиксировали в течение 24 часов при комнатной температуре забуференным формалином в объеме, более чем в 20 раз превышающем объем образца. По окончании фиксации образцы перекладывали в кассеты (АпексЛаб, Россия). Кассеты с образцами отмывали от формалина 30 минут в проточной воде, слабой струей из-под крана. Проводка материала осуществлялась путем поочередного перенесения кассет с образцами по серии изопропиловых спиртов возрастающей концентрации. Затем из 100 % изопропилового спирта переносили в равную (1:1) смесь изопропанола и о-ксилола (Химмед, Россия) на 1 час, а затем на 40 минут в о-ксилол. Пропитка парафином осуществлялась в четырех сменах предварительно расплавленного парафина Formula «R» (Leica, США) при 56°C в термостате (Смоленское СКТБ-СПУ, Россия) по 30–45 минут в каждой. Заливка образцов в расплавленный парафин проводилась в заливочных формах (АпексЛаб, Россия). После полного застывания парафина парафиновый блок извлекали из формы. Перед началом резки парафиновые блоки охлажда-

ли до -20°C . Срезы изготавливали на ротационном микротоме с ручным приводом Leica RM2125RTS (Leica, США) одноразовыми лезвиями S35 (Feather, Япония), толщина срезов 4–5 мкм. Срезы переносили на поверхность водяной бани (КБ Техном, Россия), нагретой от 35 до 49°C для расплавления парафина, и монтировались на стекла SuperFrost Plus (АпексЛаб, Россия). Полученные стекла выкладывались на нагревательный столик (КБ Техном, Россия) и в течение 15 минут подсушивались при 70°C . Готовые срезы хранились при $2-8^\circ\text{C}$. Для расплавления парафина срезы помещали в термостат (Смоленское СКТБ-СПУ, Россия) и нагревали при 60°C в течение 30 минут. Депарафинирование срезов осуществляли в двух сменах о-ксилола (Химмед, Россия) по 10 минут в каждой емкости. Затем следовала регидратация срезов в серии изопропиловых спиртов (Химмед, Россия) убывающей концентрации (100 %, 100 %, 70 %, 50 %) в емкостях по 5 минут в каждом. Срезы, освобожденные от парафина, промывали в дистиллированной воде 2 минуты.

Для визуализации ядер использовали гематоксилин Майера (БиоВитрум, Россия) по инструкции производителя. Для обозначения цитоплазмы использовали 1 % раствор эозина (БиоВитрум, Россия). Проводку проводили в сокращенном варианте, начиная с 70 % изопропилового спирта (Химмед, Россия) на 30 секунд, затем переноса препараты в две смены 100 % изопропанола по 3 минуты в каждой и в две смены о-ксилола по 3 минуты в каждой. Монтировали полученные препараты под покровное стекло в среду на основе ксилола Витрогель (БиоВитрум, Россия).

Полученные препараты исследовали с использованием микроскопа Olympus BX53 (Olympus, Япония) с набором объективов UPlanFL N 4x/0.13, UPlanFL N 10x/0.30, UPlanFL N 40x/0.75. Фотографии делали с помощью камеры Infinity 2 (Lumenera, Канада) при 40x и 100x увеличениях.

Количественную оценку окрашенных областей проводили визуально по полям зрения. Анализ изображений осуществлялся с помощью программы «Микро-анализ Pro» (ООО «ЛОМО-Микросистемы», Санкт-Петербург). Исследовали следующие показатели: длина ворсинок, ширина ворсинок, глубина крипт, ширина крипт. Статистическую обработку данных, полученных в ходе эксперимента, проводили с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel 2010 и STATISTIKA 6.0 для Windows. Средние значения изучаемых показателей представлены в виде ($M \pm m$), где M – среднее арифметическое, а m – стандартная ошибка среднего. Для анализа различий показателей между группами использовали t -критерий Стьюдента. Достоверным считали различие сравниваемых показателей при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В результате морфологических исследований установлено, что макроскопические, гистологические и морфометрические параметры стенки тонкой кишки при использовании лоперамида в дозах $0,022$ и $0,044$ мг/кг/сут не отличались от нормальных значений во все сроки эксперимента. Морфологически визуализировалась толстая слизистая, практически не нарушенная со стороны просвета, с широкими и длинными ворсинками. Среднее количество болюсов в I группе на 2-е сутки – 2,2, на 3-е сутки эксперимента – 1,4. После 3-х суток дефекация прекращалась. Во II группе на 2-е сутки эксперимента количество болюсов – 1,1, после чего дефекация прекращалась.

В III группе животных дефекация прекратилась через 72 часа после введения препарата. При аутопсии в эти же сроки обращали на себя внимание раздутые петли тонкого кишечника диаметром до 7 мм, заполненные жидким химусом и газом. Микроскопически гистологическая картина характеризовалась выраженным воспалением в строме ворсинок, выраженной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией без примесей нейтрофилов с малым количеством эозинофилов и клеток Панета. Отмечались явления суживания эпителия, участков обнажения собственной пластинки слизистой оболочки не наблюдалось. Кровенаполнение сосудов слизистой оболочки и подслизистого слоя было умеренным. Лизиса клеток не отмечалось (рис. 1).

Рис. 1. Гистологическая структура тонкой кишки у крыс в III группе исследования через 72 часа после начала эксперимента (микрофото $\times 100$).
Окр. гематоксилином и эозином

Через 120 часов после начала эксперимента в III группе при аутопсии обращали на себя внимание раздутые и отечные петли тонкого кишечника с синюшным оттенком, диаметром до 5 мм, заполненные жидким химусом и газом. Микроскопически гистологическая картина характеризовалась утончением слизистой оболочки тонкой кишки, лизисом клеток верхней части ворсинок, при этом основание ворсинок расширено из-за обилия лимфоидных клеток (рис. 2). Клетки Панета отсутствовали. При морфометрическом исследовании выявлены значительные изменения размеров ворсинок и крипт с уменьшением высоты ворсинок в 1,2 раза по сравнению с интактными животными. В просвете кишечника визуализировано много волос, непереваренной пищи и слизи.

Рис. 2. Гистологическая структура тонкой кишки у крыс в III группе исследования через 120 часов после начала эксперимента (микрофото $\times 100$).
Окр. гематоксилином и эозином

При морфометрическом исследовании животных III группы через 72 часа от начала эксперимента длина ворсинок тонкого кишечника (в различных полях зрения) составила $206 \pm 5,8$ мкм, ширина ворсинок – $54,2 \pm 1,5$ мкм, глубина крипт – $61,3 \pm 1,0$ мкм, шири-

на крипт – $25,8 \pm 0,4$ мкм ($p \leq 0,05$) (табл.). Описанные дистрофические изменения слизистой оболочки только усугублялись через 120 часов после начала применения лоперамида.

Таблица

Дозозависимое влияние применения лоперамида на морфометрические показатели и функцию кишечника крыс при создании модели динамической кишечной непроходимости в группах исследования

Группа	Доза (мг/кг/сут)	Сутки	Длина ворсинок (мкм)	Ширина ворсинок (мкм)	Глубина крипт (мкм)	Ширина крипт (мкм)	Среднее количество болюсов (сут)
I (n=12)	0,022	2	$365,3 \pm 4,3$	$65,3 \pm 0,9$	$76,3 \pm 0,6$	$31,3 \pm 0,4$	2,3
		3	$357,3 \pm 3,3$	$64,4 \pm 0,7$	$74,3 \pm 0,4$	$30,1 \pm 0,3$	1,4
		4	$342,3 \pm 3,3$	$63,4 \pm 0,4$	$72,3 \pm 0,5$	$30,2 \pm 0,6$	0
		5	$315,3 \pm 4,2$	$62,3 \pm 0,8$	$70,3 \pm 0,2$	$28,3 \pm 0,3$	0
II (n=12)	0,044	2	$345,3 \pm 4,3$	$63,3 \pm 0,9$	$70,3 \pm 0,4$	$30,3 \pm 0,6$	1,1
		3	$328,3 \pm 2,9$	$61,0 \pm 0,5$	$69,3 \pm 0,3$	$30,6 \pm 0,5$	0
		4	$310,3 \pm 3,8$	$60,3 \pm 0,7$	$68,3 \pm 0,5$	$29,3 \pm 0,3$	0
		5	$295,3 \pm 2,8$	$59,3 \pm 0,9$	$65,3 \pm 0,4$	$27,3 \pm 0,4$	0
III (n=12)	0,09	2	$235,3 \pm 3,8$	$60,3 \pm 0,7$	$66,3 \pm 0,6$	$28,3 \pm 0,5$	0
		3	$205,4 \pm 6,3^*$	$55,3 \pm 1,3^*$	$62,3 \pm 0,9^*$	$26,3 \pm 0,5^*$	0
		4	$199,2 \pm 4,5$	$52,1 \pm 0,9$	$60,5 \pm 1,1$	$24,1 \pm 0,7$	0
		5	$145,5 \pm 5,2^*$	$42,3 \pm 0,8^*$	$53,3 \pm 0,9^*$	$22,3 \pm 0,3^*$	0

* – достоверность изменений значений при $p \leq 0,05$ по отношению к предыдущему дню исследования.

Проведенное экспериментальное исследование позволило, используя фармакологические эффекты лоперамида в дозе 0,09 мг/кг/сут, воссоздать модель ДКН на крысах. Нарушение транзита кишечного химуса по кишечнику приводило к характерным изменениям кишечной стенки. Степень макро- и микроскопических изменений кишечника зависела от длительности введения препарата и к завершению эксперимента характеризовалась выраженными дистрофическими и парабактериальными изменениями.

При использовании известных инвазивных моделей, в том числе послеоперационной динамической кишечной непроходимости, помимо механического фактора воздействия на кишечную стенку, нельзя исключить медикаментозного влияния, так как животные подвергались операции и введению наркотических препаратов [9]. Используемая модель позволяет исключить влияние множества дополнительных факторов.

Данная модель ДКН отличается простотой применения, позволяет избежать токсического влияния препарата и может быть использована для изучения стадий развития динамической кишечной непроходимости, ее патогенеза, дает возможность опреде-

лить степень жизнеспособности кишечника. По нашему мнению, апробация новых методов лечения ДКН на данной модели будет практична и в конечном итоге позволит улучшить результаты лечения данного заболевания у человека.

Заключение. Функциональные, макро- и микроскопические изменения кишечника при предложенном способе моделирования ДКН на крысах с применением опиоидного препарата, производного пиперидина, – лоперамида доказывают, что данная методика может быть использована в экспериментальной хирургии.

Информированное согласие: Исследования на всех этапах были выполнены в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025–2009, ГОСТ Р ИСО 5725–2002 и «Правилами лабораторной практики», утвержденными приказом Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н. Эксперимент проходил с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU], после получения положительного решения этического комитета (протокол № 3 от 31.10.2011).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Griffiths Sh., Glancy D. G. Intestinal obstruction. *Surgery*. 2020;38(1):43-50. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.10.014>
2. Rami Reddy S. R., Cappell M. S. A Systematic Review of the Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment of Small Bowel Obstruction. *Current Gastroenterology Reports*. 2017;19(6):28. <https://doi.org/10.1007/s11894-017-0566-9>
3. Paulson E. K., Thompson W. M. Review of Small-Bowel Obstruction: The Diagnosis and When to Worry. *Radiology*. 2015;275(2):332-342. <https://doi.org/10.1148/radiol.15131519>
4. Reddy R., Ravinder N. A Study on Intestinal Obstruction. *Annals of International Medical and Dental Research*. 2019;5(3):SG45-SG46. <https://doi.org/10.21276/aimdr.2019.5.3.SG12>
5. Sheyn D., Bretschneider C. E., Mahajan S. T., Ridgeway B., Davenport A., Pollard R. Incidence and risk factors of early postoperative small bowel obstruction in patients undergoing hysterectomy for benign indications. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2019;220(3):251. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.11.1095>
6. Leite Jr. R., Mello N. B., Pereira L. P. M., Takiya C. M., Oliveira A. B., Schanaider A. Enterocyte ultrastructural alterations following intestinal obstruction in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2010;25(1):2-8. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502010000100003>
7. Li L., Zou C., Zhou Z., Wang X., Yu X. Phenotypic changes of interstitial cells of Cajal after intestinal obstruction in rat model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2019;52(10):e8343. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198343>
8. Аманова Д. Е., Койшибаев Ж. М., Ахмалдинова Л. Л., Матюшко Д. Н., Тургунов Е. М. Динамика липополисахарид связывающего белка и прокальцитонина при экспериментальной кишечной непроходимости. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1):145-148. [Amanova D. E., Koyshibaev Zh. M., Akhmaltdinova L. L., Matyushko D. N., Turgunov E. M. The dynamics of levels of lipopolysaccharide-binding protein and procalcitonin during the experimental acute intestinal obstruction. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza*. – *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1):145-148. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14001>
9. van Bree S. H., Nemethova A., van Bovenkamp F. S., Gomez-Pinilla P., Elbers L. [et al.]. Novel method for studying postoperative ileus in mice. *International Journal of Physiology Pathophysiology Pharmacology*. 2012;4(4):219-227.

Сведения об авторах:

Топчиев Михаил Андреевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии с курсом последипломного образования; тел.: 89170805592; e-mail: topchievma@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-9164-7831>

Паршин Дмитрий Сергеевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры; тел.: 89654545168; e-mail: parshin.doc@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-1050-7716>

Бруснев Лев Андреевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей хирургии; тел.: 89283105342; e-mail: brusneff@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-4208-2695>

Чотчаев Марат Казбекович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры; тел.: 89383509323; e-mail: Chotcha.mk@gmail.com; <http://orcid.org/0000-0002-6546-8646>